

106



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTOS GENETICOS DE LAS CASIOPEINAS EN *Drosophila melanogater*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

RUIZ GARNICA MYRIAM MARGARITA

286652



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2000





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado Asignago:**

**Presidente:** Profa. Bertha Resendiz Vazquez  
**Vocal** Prof. Carlos Perez Muñoz  
**Secretario** Profa. Dra Ma Esther de la Rosa Duque  
**1er suplente** Francisco Hernandez Luis  
**2nd suplente** Maria Teresa Guitierrez Lugo

**S ITO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

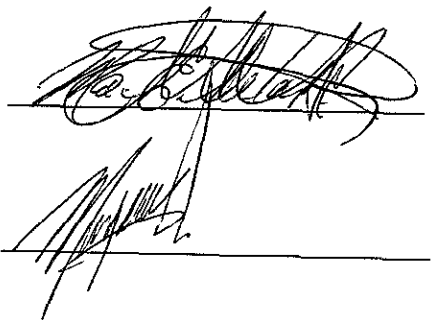
Laboratorio 100, Unidad de Posgrado. Edificio B Facultad de Quimica.  
Ciudad Universitaria , México Distrito Federal.

**Asesor:**

**Dra Ma Esther de La Rosa Duque**

**Sustentante**

**Miryam Margarita Ruiz Garnica**



*A mi mamá Beatriz Garnica, por todo su amor, dedicación,  
paciencia, apoyo y por todo lo que me ha enseñado y dado.*

*A mi hijo Ian Kaare por ser uno de los motores que impulsa  
mi vida.*

## Agradecimientos

A la Dra. Ma. Esther de La Rosa por toda tu confianza, apoyo, consejos, tiempo, cariño, amistad y por todo lo que de ti he aprendido.

A mi abuelita Margarita por todos tus cuidados y amor durante toda mi vida.

A mi abuelita Sofía (e.p.d.) por todo tu cariño. Espero que donde quiera que estes te sientas orgullosa de mi. Te extraño.

A mis tias Elena Ruiz y Elena Garnica por todo su apoyo y amor a lo largo de mi vida.

A Ramiro Danache, Pedro Villanueva y Manuel Saavedra por todo lo que me enseñaron, por su apoyo, cariño y amistad.

A Raúl Garza por todo su apoyo para finalizar mi carrera.

A Ceci, Chayo, Rebe, Sayra, Mara, Tere, Oscar de Anda, Felipe, Mauricio, al oso (Jorge Vieyra) y Giovana por todos los momentos que hemos compartido y hacer mi estancia en la universidad mas leve y sobre todo por su amistad.

A Ros Galindo, por todo el apoyo logistico para la relización de esta tesis pero más que nada por su cariño y amistad.

A Eduardo Pedraza porque has estado conmigo en las buenas, las malas y las peores, por tu confianza, cariño y amistad durante casi 10 años.

**Agradezco el apoyo otorgado para la realización de este trabajo a través de los proyectos  
DGAPA IN218399 y CONACYT 21510-N**

**Así Como a la Doctora Lena Ruiz Azuara y la M en C Isabel Gracia Mora por todo su  
apoyo en este proyecto.**

*El merito no esta en tomar un camino  
sino en recorrerlo hasta el final*

*Miryam Ruiz  
diciembre del 2000*

## Resumen

En nuestro grupo se ha sintetizado una serie de compuestos denominados Casiopeínas, que son compuestos de coordinación que tienen como centro metálico Cu II. En la esfera de coordinación se presenta un ligante bidentado neutro del tipo diiminas (N-N) y otro cargado que puede ser aminoacidato(N,O) o donadores (O,O).

Estos compuestos han demostrado tener actividades citostática, citotóxica y antineoplásica. En modelos *in vivo* e *in vitro*. Parte de la batería de pruebas que se debe de realizar a un medicamento antes de pasar a la fase clínica están las de mutagenicidad y genotoxicidad. Para llevar a cabo estas pruebas se han utilizado técnicas como la de SMART "Somatic Mutation and Recombination Test" (pruebas de mutación y recombinación somática) en *Drosophila melanogaster*. Utilizando individuos de la línea mwh "multiple wing hair" y de la línea fl<sup>3</sup>, hembras y machos respectivamente, se obtuvieron larvas transheterocigas a las que se dio tratamiento crónico vía oral con las Casiopeínas. Se colectaron los adultos emergidos se disectaron sus alas y se montaron en preparaciones fijas para su análisis microscópico.

Las Casiopeínas probadas fueron: I glicina, II serina, III glicina y III-E. El análisis microscópico de las alas reveló la frecuencia de mutación y recombinación somáticas inducidas por la administración de las Casiopeínas. Los resultados se trataron estadísticamente con el programa de análisis estadístico SMART. Se observó que las casiopeínas incrementan la frecuencia de mutación. Se concluyó que existe una relación estructura actividad (inducción de mutación y recombinación somáticas) dada por los sustituyentes periféricos de las Casiopeínas probadas.



# Índice

Introducción.....	3
Genética Toxicológica .....	3
Alteraciones del material genético.....	3
1 Antecedentes.....	5
1.1.1 Cancer .....	5
1.1.2 Origen Etiológico .....	5
1.1.3 Clasificación de las neoplasias .....	5
• Neoplasias benignas .....	6
• Neoplasias Malignas.....	6
• Metástasis.....	6
1.1.4 Terapias Actuales .....	6
1.1.4.1 Quimioterapia.....	6
2 Desarrollo de un nuevo medicamento.....	8
3 Desarrollo de compuestos de coordinación de cobre (II) con actividad antineoplásica .....	10
3.1 Diseño y Síntesis de las Casiopeínas.....	10
3.1.1 Caracterización fisicoquímica de las Casiopeínas.....	13
3.2 Pruebas de Cernimiento.....	14
3.3 Pruebas de la Fase Preclínica I.....	15
3.3.1 Mecanismo de acción.....	15
3.3.2 Farmacocinética.....	15
3.3.3 Farmacodinámica.....	16
3.3.4 Pruebas Toxicológicas .....	16
3.3.4.1 Pruebas de Genotoxicidad.....	17
4 <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema de prueba.....	19
4.1 Ciclo de Vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	20
5 Pruebas de toxicidad en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	24
6 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	25
7 Objetivo.....	29
8 Hipótesis.....	30
9 Metodología.....	31
9.1 Determinación de la toxicidad de las Casiopeínas en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> 31	32
9.2 Ensayo de mutación somática y recombinación genética SMART .....	32
9.2.1 Clasificación de las manchas.....	33
10 Resultados.....	35
10.1 Toxicidad en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	35
10.2 Resultados de la prueba de Mutación y recombinación somática.....	38
11 Discusión de Resultados.....	46
12 Conclusiones .....	49
13 Bibliografía: .....	50

## Índice de figuras

Figura 1 Diagrama de flujo propuesto para el desarrollo de compuestos con actividad antineoplásica .....	11
Figura 2 Estructura general de las familias de Casiopeínas I, II y III .....	12
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
Figura 4 Moscas adultas de <i>DROSOPHILA melanogaster</i> .....	23
Figura 5 Diagrama de pata de mancho de <i>Drosophila melanogaster</i> y vista ventral del abdomen de la hembra (izquierda) y de abdomen del macho (derecha) .....	23
Figura 6 Eventos mutagénicos que se observan como manchas de mutación y recombinación somática SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	28
Figura 7 Ala de <i>Drosophila melanogaster</i> dividida por regiones de la A-E .....	33
Figura 8 Tricomos de las alas. a) normales, b) tricomas derivados del fenotipo de mwh y flr, c) configuración indicativa mwh. d) manifestación de flr .....	34

## Índice de Tablas

Tabla I Clasificación químico estructural de las Casiopeínas en familias .....	13
Tabla II Toxicidad en toxicidad de la Casiopeína I glicina .....	35
Tabla III Toxicidad de la Casiopeína II glicina .....	35
Tabla IV Toxicidad de la Casiopeína II serina .....	35
Tabla V Toxicidad de la Casiopeína III-E .....	36
Tabla VI Toxicidad de Nitrato de cobre II .....	36
Tabla VII Efecto de la Casiopeína I glicina en células somáticas del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	38
Tabla VIII Efecto de la Casiopeína II glicina en células somáticas del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	38
Tabla IX Efecto de la Casiopeína II serina en células somáticas del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39
Tabla X Efecto de la Casiopeína III-E. en células somáticas del ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Comparación de la relación dosis-respuesta de las Casiopeínas probadas en el ensayo SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	37
<b>Gráfica 2.</b> Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeína I glicina en el ensayo de SMART en ala <i>Drosophila melanogaster</i> .....	40
<b>Gráfica 3.</b> Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeína II glicina en el ensayo de SMART en ala <i>Drosophila melanogaster</i> .....	41
<b>Gráfica 4.</b> Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeína II serina en el ensayo de SMART en ala <i>Drosophila melanogaster</i> .....	42
<b>Gráfica 5.</b> Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeína III -E en el ensayo de SMART en ala <i>Drosophila melanogaster</i> .....	43
<b>Gráfica 6.</b> Compoaración de la dosis respuesta de las Casiopeínas porbadas en el ensayo de SMART en ala <i>Drosophila melanogaster</i> .....	44
<b>Gráfica 7.</b> Comparación de la frecuencia de inducción de manchas por los tratamientos dados con las Casiopeínas en el ensayo SMART en ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	45

# Introducción

## **Genética Toxicológica**

La Genética toxicológica identifica y analiza la actividad tóxica de diversos agentes que actúan sobre el material genético de los sistemas vivos. Un agente genotóxico es aquel que tiene la capacidad de inducir cambios alterando la información heredable en el genotipo (Wright 1980)<sup>8</sup>, puede ser físico, químico o biológico (Brusick, 1987)<sup>9</sup>. La genética toxicológica estudia eventos tales como la mutagénesis, que es la inducción de alteraciones en la información contenida en el ADN de un organismo o una célula y que no sucede a través del proceso de recombinación.

### **Alteraciones del material genético.**

Las alteraciones al material genético se pueden dividir en dos grandes grupos:

a) **Mutaciones puntuales**

Son alteraciones en los nucleótidos del ADN y pueden ser detectadas por cambios en el genotipo de la célula.

b) **Aberraciones cromosómicas**

Son alteraciones en la estructura de los cromosomas.

Las mutaciones se pueden dividir según el tipo de células que afectan en:

- Germinales
- Somáticas.

Las mutaciones germinales se definen como las alteraciones genéticas que ocurren en las células destinadas a desarrollarse como células germinales y que pueden intervenir en la formación de individuos de las generaciones siguientes.

Las mutaciones somáticas se pueden definir como las que ocurren en células somáticas cuyo resultado es la expresión de características que no son propias de la línea celular a la que pertenecen. Este tipo de daño al ADN no es transmitido a los individuos de la progenie.

El daño genotóxico se puede inducir cuando el organismo se encuentra sometido a concentraciones de xenobióticos (todo agente ajeno al organismo o del mismo que se encuentren en concentraciones muy por debajo de los niveles normales o muy por encima de estos) tales que al interactuar con los ácidos nucleicos producen alteraciones. Se ha establecido que el ADN es "blanco" de diversos agentes que inducen alteraciones en su estructura, las cuales al no ser reparadas son heredadas a la progenie celular (William *et al* 1994)<sup>14</sup> Estos cambios irreversibles en las células aumentan la probabilidad de convertirse en tumores, esto depende de la magnitud y tipo de lesión del ADN, así como de otros factores. La importancia de lo anterior radica en la asociación que hay entre la actividad mutagénica de los xenobióticos y la inducción de tumores cancerosos. Sin embargo debemos aclarar que todos los genotóxicos carcinógenos son mutágenos, pero no necesariamente los mutágenos son carcinogénicos (Shawn , Jones, 1994).<sup>15</sup>

# 1 Antecedentes

## 1.1.1 Cancer

Es el crecimiento descontrolado de células anormales derivadas de tejidos normales, que eventualmente puede causar la muerte por la diseminación de estas a otros sitios del organismo diferentes al de origen

La Carcinogénesis se caracteriza por el crecimiento anormal de células, que no responden a los *mecanismos de regulación de la división celular*. Estas células se multiplican a mayor velocidad que las células adyacentes dando como resultado la formación de una neoplasia (Dimitros, *et al.* 1999)<sup>17</sup>.

## 1.1.2 Origen Etiológico

Las causas del cáncer se pueden clasificar en

- a) Predisposición genética
- b) Condiciones ambientales (ocupacionales, dieta, fármacos, contaminantes, etc)
- c) Factores Ambientales que interaccionan con el material genético (físicos, químicos y biológicos)
- d) Desconocidos.

## 1.1.3 Clasificación de las neoplasias

- **Neoplasias benignas**

Las neoplasias benignas o tumores benignos se caracterizan por estar localizados y delimitados por una membrana basal o cápsula que la separan de los tejidos adyacentes

- **Neoplasias Malignas**

Las Neoplasias malignas o cáncer se forman a partir de la proliferación de células que no responden a las señales de control, y se caracterizan por su habilidad para invadir otros tejidos, produciendo nuevos tumores y la muerte de los tejidos adyacentes, al competir con ellos por los nutrientes perturbando así la integridad funcional del tejido en cuestión.

- **Metástasis**

La diseminación del cáncer (metástasis); se da por la perdida de la integridad del tumor cuyas células pueden trasladarse a otras zonas del cuerpo vía torrente sanguíneo y/o linfático invadiendo nuevos tejidos

#### **1.1.4 Terapias Actuales**

En la actualidad las terapias contra el cáncer las podemos dividir en tres tipos diferentes que pueden usarse de manera individual o combinada

- Cirugía: involucra una extirpación y el sacrificio de un órgano o región anatómica
- Radioterapia: utiliza materiales radiactivos que tienen un efecto letal en las células.
- Quimioterapia: involucra el uso de medicamentos de acción antitumoral conocida

### 1.1.4.1 Quimioterapia

La quimioterapia es una de las alternativas más viables hoy en día pese al costo que esta implica. Sin embargo el factor limitante de esta es la toxicidad y los efectos colaterales que conlleva.

Los agentes quimioterapéuticos pueden agruparse de acuerdo a su estructura química y sus mecanismos de acción.

Por sus mecanismos de acción se pueden agrupar en:

- Agentes alquilantes: Cisplatino, Mitomicina C
- Antimetabolitos: hidroxiaurea, timidina, afidicolina
- Inhibidores mitóticos: vincristina
- Antibióticos antitumorales: bleomicina, adriamicina
- Hormonas: estrógenos
- Misceláneos

La tendencia actual en el diseño de nuevos fármacos antineoplásicos es que estos presenten selectividad y que su mecanismo de acción sea directamente sobre el ADN del tejido antineoplásico.

## 2 Desarrollo de un nuevo medicamento

Los protocolos para el desarrollo de una nueva forma farmacéutica, indican una serie de etapas y pruebas con las que hay que cumplir para garantizar la seguridad del nuevo fármaco así como su eficacia. Las fases que se deben seguir en el desarrollo de medicamentos antes de llegar al consumidor son:

- Diseño y síntesis a escala de laboratorio o descubrimiento de un nuevo principio activo y caracterización fisicoquímica de la molécula en cuestión.

- Cernimiento

Son una serie de pruebas *in vitro* e *in vivo*, que nos dan indicio de la actividad farmacológica o bioquímica de la molécula. Dada la diversidad de moléculas con posible actividad farmacológica que son sintetizadas o aisladas, la investigación de nuevos principios activos se lleva a cabo fijando un objetivo particular, planificando la investigación en torno de un objetivo médico. En nuestro grupo de trabajo el objetivo es desarrollar agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.

- Fase preclínica I

Durante esta fase se llevan a cabo pruebas de toxicidad aguda en por lo menos dos especies animales, dosis letal 50 y observaciones farmacológicas que incluyen efectos colaterales a dosis agudas y duración de los efectos.

- Fase preclínica II

Los compuestos que alcanzan esta fase son sometidos a estudios de farmacocinética, toxicidad subcrónica, y estudios toxicológicos profundos entre los que se encuentran los de genotoxicidad, toxicología de la reproducción (fertilidad, teratogenicidad y toxicidad perinatal y postnatal), estudios de carcinogénesis y toxicidad crónica.



Si el principio activo demuestra no provocar daños irreversibles entonces se realiza el desarrollo de la forma farmacéutica tentativa, la que será utilizada en la fase clínica uno.

- Fases Clínicas (I, II y III)

Con la finalidad de demostrar la tolerancia en humanos en la fase clínica el nuevo medicamento es administrado a personas sanas, se realizan los estudios de farmacocinética humana, de eficacia en pacientes, y se hacen ensayos terapéuticos para establecer el perfil terapéutico definitivo y se prueban las interacciones con medicamentos.

- Fase Clínica IV

La fase clínica cuatro es un seguimiento del medicamento especialmente de los eventos adversos no deseados que se puedan presentar. Una vez realizadas todas estas pruebas se presenta el dictamen clínico, farmacológico, toxicológico y farmacéutico a la Secretaría de Salud para obtener el registro sanitario correspondiente que permita la introducción del medicamento al mercado

Sin embargo el protocolo para el desarrollo de un fármaco antineoplásico o para el tratamiento de cáncer difiere del antes descrito. Debido a la toxicidad que presentan estos compuesto el panel de pruebas y fases a seguir es diferente. Existe una serie de pruebas de cernimiento de estos fármacos sugeridas por National Cancer Institute (Gerand,1987)<sup>3</sup> dentro de su programa Cancer Chemotherapy National Service Center de los Estados Unidos de Norteamérica (Bush,1962)<sup>1</sup>. Que es el que se sigue en el desarrollo de los fármacos antineoplásicos denominados Casiopeínas.

### 3 Desarrollo de compuestos de coordinación de cobre (II) con actividad antineoplásica

#### 3.1 Diseño y Síntesis de las Casiopeínas

Las Casiopeínas son compuestos de coordinación con centro metálico que en la esfera de coordinación presentan un ligante bidentado neutro del tipo diiminas(N,N) y otro cargado que puede ser aminoacidoato (N,O) o donador (O,O). Las características químico estructurales de estos compuestos ha permitido sintetizar alrededor de 100 compuestos con diferentes sustituyentes. Las Casiopeínas fueron diseñadas y sintetizadas en la Facultad de Química (figura 1) , de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara( Ruiz-Ramírez , 1997,1994,1993,1992)<sup>4-7</sup>.

El grupo de trabajo se planteó sintetizar compuestos de coordinación, con un centro metálico que tengan actividad antineoplásica (Ruiz et al 1996)<sup>24</sup>, que coinciden con los postulados de Rosenberg derivados del conocimiento farmacodinámico del cis-platino en líneas tumorales. Destacando por su importancia los siguientes:

- Estos complejos deben intercambiar rápidamente solo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas
- Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante en la especie viva.
- Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o un bidentado) como grupos salientes.
- los isómeros *trans* son inactivos.
- La velocidad de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- los ligantes no intercambiables en las moléculas deben estar fuertemente enlazados.

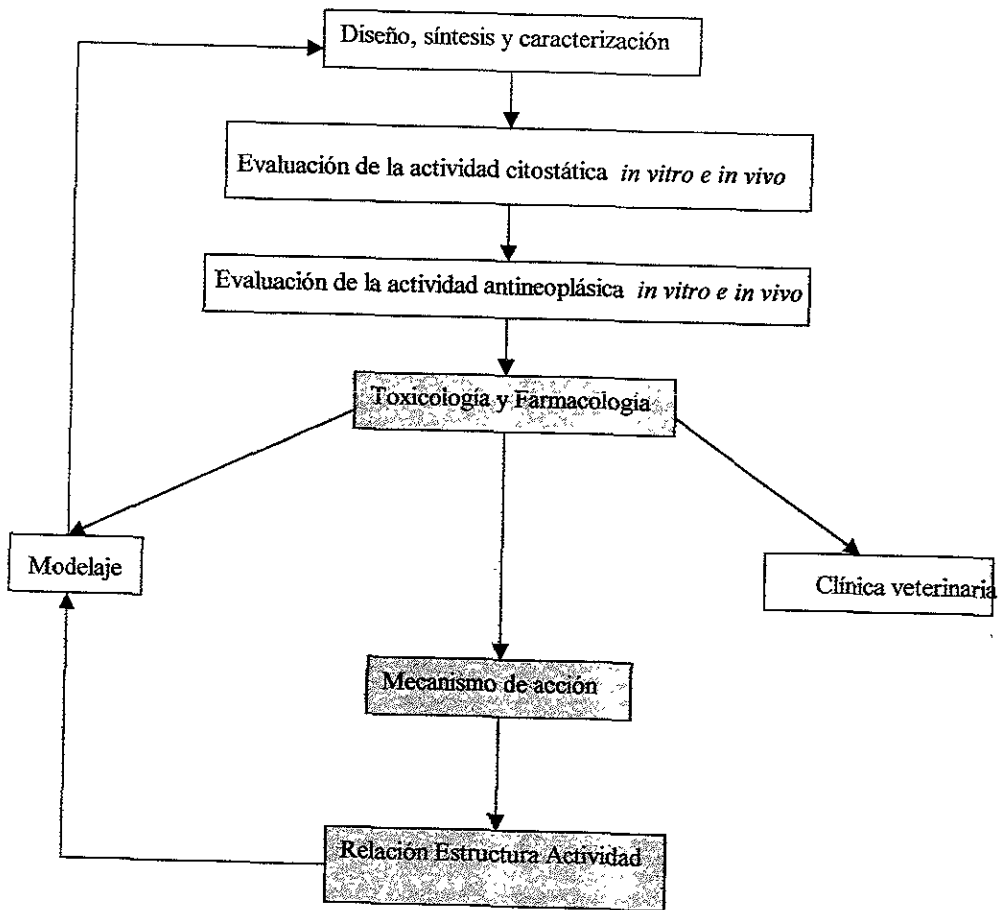
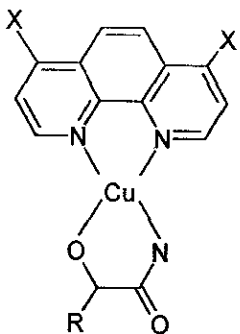


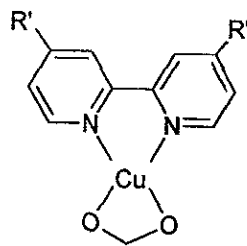
Figura 1 Diagrama de flujo propuesto para el desarrollo de compuestos con actividad antineoplásica



Casiopeínas I y II

**X= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> para la Casiopeína I**

**X= CH<sub>3</sub> para la Familia II de  
Casiopeínas**



Casiopeína III

**R= H; glicina**

**R=CH<sub>2</sub>-OH; serina**

**R'= fenilo o metilo**

**Figura 2 Estructura general de las familias de Casiopeínas I, II y III.**

### 3.1.1 Caracterización fisicoquímica de las Casiopeínas:

La estructura de las Casiopeínas ha sido determinada utilizando difracción de rayos X, (Gasque *et al.* 1996)<sup>19</sup>, (figura 2) y clasificadas en familias con base a sus características químico- estructurales (tabla 1) los compuestos sintetizados fueron caracterizados utilizando diferentes técnicas como el infrarrojo, conductividad, análisis elemental, espectrofotometría UV-visible. También se determinaron las constantes de estabilidad, por espectrofotometría (Gasque, 1996<sup>20</sup>; Villar, 1996<sup>18</sup>; Ruiz *et al.* 1996)<sup>21</sup>. Así como la estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones filológicamente compatibles, solución salina 0.9%, solución Hartmann y glucosa al 5% (Romero *et al.*, 1996)<sup>22</sup>.

Tabla I Clasificación químico estructural de las Casiopeínas en familias

Donador N-N	Donador O-O / O-N				
	ACAC	SALAL	SERINA	VALINA	GLICINA
1,10-fenantrolina	CasIII B	CasIII B			
4,7dimetil,1,10fenantrolina	CasIII E	CasIII B	CasII-ser	CasII-val.	CasII-gli
4,7,difenil,1,10fenantrolina	CasIII F	CasIII B	CasI-ser	CasI-val.	CasI-gli
3,4,7,8 tetrametil,1,10 fenantrolina					CasV-gli
2,2bipiridina	CasIII D	CasIII J			
4,4,dimetil2,2,bipi	CasIII I	CasIII G			CasIV-gli

Casiopeínas probadas

### **3.2 Pruebas de Cernimiento**

Los ensayos de cernimiento de las Casiopeínas fueron llevados a cabo en la Facultad de Química utilizando modelos tumorales murinos para comprobar su actividad antineoplásica, además de estudios preliminares de la actividad citostática (Ruiz, et al. 1996)<sup>24</sup>. Utilizando los protocolos establecidos por el National Cancer Institute. Con este ensayo las Casiopeínas demostraron su potencial como fármacos antineoplásicos.

Dentro del panel de cernimiento sugerido por el National Cancer Institute de Estados Unidos de Norteamérica, se sugiere realizar al comienzo de la investigación estudios toxicológicos, por lo que se realizaron estudios histopatológicos de las Casiopeínas utilizando como vía de administración la intraperitoneal (Tinoco; 1993)<sup>36</sup>. Estos ensayos fueron realizados en ratones. Después se realizaron el mismo estudio en ratones por vía intravenosa (Quiroz; 1996)<sup>39</sup>. Ambos estudios demostraron que las Casiopeínas tienen una toxicidad menor a la del cisplatino.

Con la Casiopeína II se hicieron estudios *in vitro* y observo que se une a proteínas plasmáticas y entra en los eritrocitos causando hemólisis (Dobrota, et al. 1998)<sup>34</sup>, Fuentes<sup>35</sup> reporto que la Casiopeína II se une a proteínas plasmáticas humanas en un 34.77% *in vitro*.

### 3.3.3 Farmacodinámica

En los estudios farmacodinámicos de la Casiopeína I en el modelo de ratón produce cambios patológicos de tipo circulatorio presentándose hemorragias, congestión y edema (ascitis e hidrotórax) al igual que otros quimioterapéuticos, (Tinoco, et al.1996)<sup>36</sup>. La Casiopeína II produce hemólisis y es capaz de oxidar a las lipoproteínas especialmente a las lipoproteínas de baja densidad (LDL), (Dobrota, et al. 1998)<sup>37</sup>.

### 3.3.4 Pruebas Toxicológicas

Dentro del panel de pruebas toxicológicas fueron realizados estudios de cardiotoxicidad en corazón aislado de conejo, donde se observo que la Casiopeína I tiene efecto cronotrópico adverso (Romero et al 1996)<sup>38</sup>.

Para determinación de la dosis letal 50 y concentración letal 50 se emplearon diferentes líneas tumorales tanto humanas como murinas (Gracia, et al. 1998)<sup>41</sup> y fueron determinados los perfiles de toxicidad aguda en ratas y ratones (Rivera, et al 1998)<sup>40</sup>. Con el estudio en ratones se concluyó que la apertura del anillo fenantrolinico en la molécula disminuye la toxicidad y se encontró que esta regida por el donador (N,N) siendo las menos toxicas las moléculas 5-NO<sub>2</sub>-fenantrolina (Bravo, et al.1998)<sup>42</sup>.

### 3.3.4.1 Pruebas de Genotoxicidad

Con la finalidad de determinar si hay interacción por parte de las Casiopeínas con el ADN, se han realizado diferentes pruebas siguiendo los protocolos del National Cancer Institute y Cancer Chemoterapy National Service Center el daño genotóxico se determina en función de los siguientes pruebas:

- Sensibilidad diferencial del efecto citotóxico
- Frecuencia basal en *Salmonella tiphimurium*
- Inducción del sistema SOS en *Escherichia coli*

Se observó que no hay aumento en la frecuencia basal de reversiones en *Salmonella*, los resultados del cromosoma ensayo en *E. Coli* mostraron que los fármacos no logran inducir el sistema SOS. Sin embargo las pruebas de toxicidad diferencial en cepas con deficiencias en mecanismos de reparación del ADN sugiere que algunas Casiopeínas tienen efecto genotóxico, (Cano, et al. 1998)<sup>43 y 44</sup>. Con la finalidad de probar si se produce daño genético en células eucariontes se utilizó el ensayo cometa y de citotoxicidad en leucocitos. El primero muestra la genotoxicidad con base al grado de fragmentación del ADN. Al comparar el daño genético con el testigo positivo observaron que es mayor; el 77% de las Casiopeínas producen fragmentación al ADN, lo que sugiere que la degradación del ADN no es consecuencia de la muerte celular sino de las lesiones inducidas en el genoma. Sin embargo la citotoxicidad en linfocitos es escasa, probablemente se deba a que las lesiones no se observan ya que la célula no se divide.



En la prueba de síntesis no programada de ADN en cultivo primario de hepatocitos de rata se probaron las Casiopeínas I-glicina, I-serina, II serina, y III-E. Se observó que las Casiopeína probadas inducen síntesis no programada del ADN en las células expuestas, también se observó que a altas dosis produce citotoxicidad.

#### **4 Drosophila melanogaster como sistema de prueba**

*Drosophila melanogaster*, es un organismo eucarionte cuyo estudio ha ido de la mano con el desarrollo de la genética toxicológica a raíz de los estudios de Müller en 1927 y Auerbach<sup>47</sup> en 1945 pioneros en esta área. *Drosophila melanogaster* tiene cuatro pares de cromosomas (X Y, 2, 3 y 4) se han obtenido numerosas mutaciones que se utilizan como marcadores genéticos y el genoma ha sido secuenciado. Con ella se pueden realizar pruebas *in vivo* para determinar un amplio espectro de eventos genéticos tanto en células somáticas como en las germinales, utilizando las cepas de laboratorio o bien las moscas de la naturaleza. La experimentación se puede desarrollar en condiciones ambientales naturales o de laboratorio, o bien combinando ambas.

El ensayo de letales recesivos ligados al sexo, utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo es actualmente un ensayo validado y aceptado internacionalmente, ya que se ha demostrado una clara correlación entre la respuesta mutagénica y la actividad carcinogénica del compuesto en cuestión. *Drosophila melanogaster* es un sistema que nos permite detectar la presencia de daño genético inducido *in vivo* por diversos compuestos en un periodo relativamente corto, debido a la duración de su ciclo de vida. Además nos ofrece las ventajas de ser de bajo costo y de poder obtener un gran número de individuos por generación, así como de tener una actividad metabólica que permite la activación de xenobióticos ( ya que posee el sistema citocromo p450).

#### 4.1 Ciclo de Vida de *Drosophila melanogaster*

*Drosophila* es un insecto holometábolo que sufre metamorfosis completa, presenta dimorfismo sexual, habita los mismos medios que el hombre y se alimenta especialmente de frutos en fermentación. En condiciones estándar de laboratorio a temperatura de 25°C y 60 % de humedad relativa la secuencia y duración aproximada de los diferentes estados de su ciclo de vida es:

Desarrollo embrionario	1 día
Larva de 1er. estadio	1 día
Larva de 2o. estadio	1 día
Larva de 3er. estadio	2 días
Pre-pupa	4 horas
Pupa	4.5 días
Adulto	40 a 50 días

La duración promedio del ciclo de vida es de diez días (figura 3), lo que permite obtener varias generaciones en un año. Por su pequeño tamaño se cultiva en espacios reducidos y a un costo bajo.

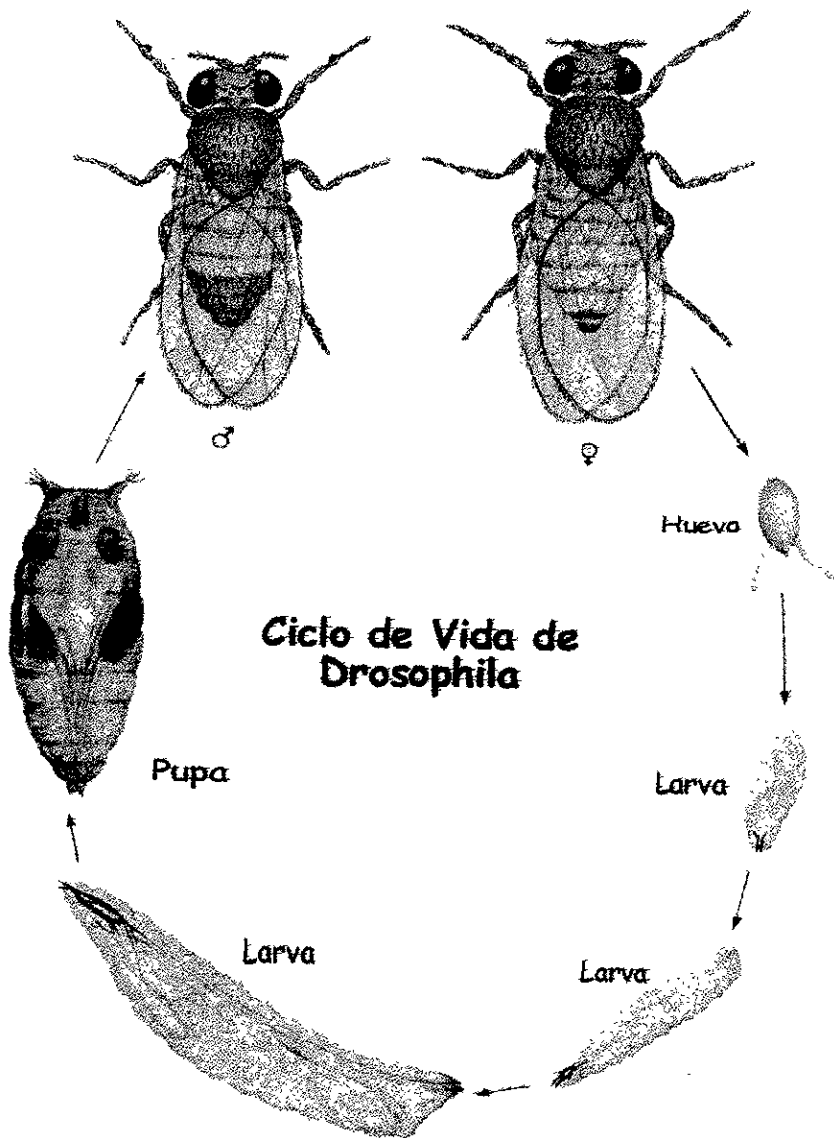


Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Las larvas de *Drosophila melanogaster* eclosionan del huevo a las 24 hr. estas sufren dos mudas, que marcan los tres estadios larvarios que tienen una duración total de 96 hr. Es durante el segundo (a las 48 hr.) que las larvas son tratadas con las sustancias de prueba en el ensayo SMART. Las células que se emplean en la detección de daño genético son las de los discos imagales, estas estructuras se presentan en la larva como pequeños sacos; que más adelante formarán prácticamente todas las estructuras internas y externas en el adulto (Wilkins, 1985)<sup>48</sup>. Durante este proceso las células son susceptibles a sufrir alteraciones. Si ocurre una alteración heredable en cualquiera de ellas, esto dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada, formando un clon que se ve como una “mancha” en la estructura, (al emplear los marcadores fenotípicos correspondientes) ya que las células de los discos imagales se reproducen por divisiones mitóticas a lo largo de los tres estadios larvarios (figura 3), hasta el estadio de prepupa momento en el cual se dan las últimas divisiones. A las 96 hr. las larvas se fijan en una superficie seca (pared del frasco de cultivo) y pupan dentro de la última cubierta larvaria; que se torna dura y se oscurece dando paso a la metamorfosis. Durante este último estadio las células de los discos imagales se diferencian, dando lugar a las estructuras del adulto. Al término de la metamorfosis la mosca emerge siendo al principio muy clara y alargada (figura 4).

Las moscas adultas al emerger se pueden separar fácilmente en hembras y machos con base a sus características morfológicas (figura 4). El abdomen de la hembra tiene siete segmentos, el terminal se observa puntiagudo con una pequeña protuberancia al final. Mientras que el macho muestra cinco segmentos fusionados que le dan una forma redondeada y oscura, adicionalmente los machos cuentan con una fila de aproximadamente 10 cerdas gruesas denominado peine sexual en la superficie del segmento superior de la pata anterior (figura 5).

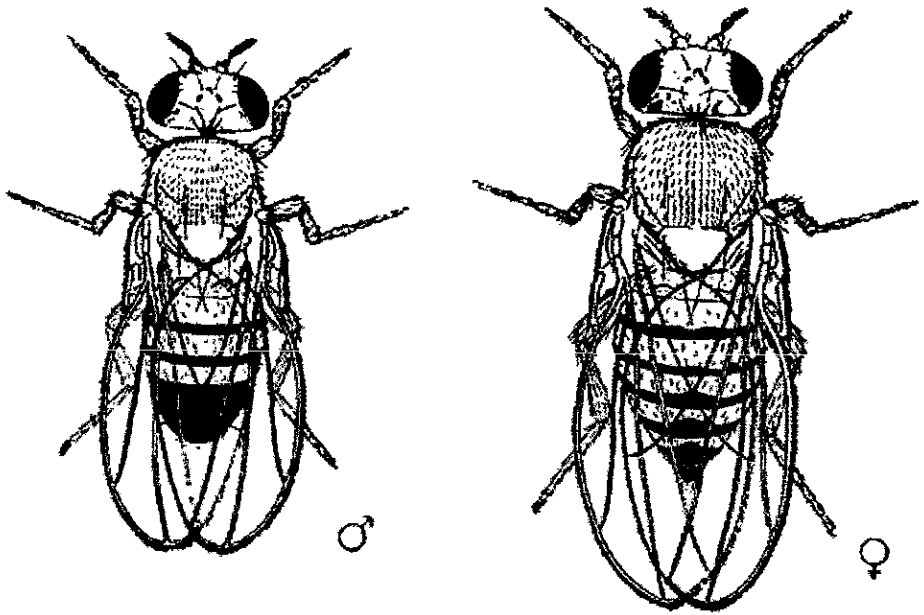


Figura 4 Moscas adultas de DROSOPHILA melanogaster

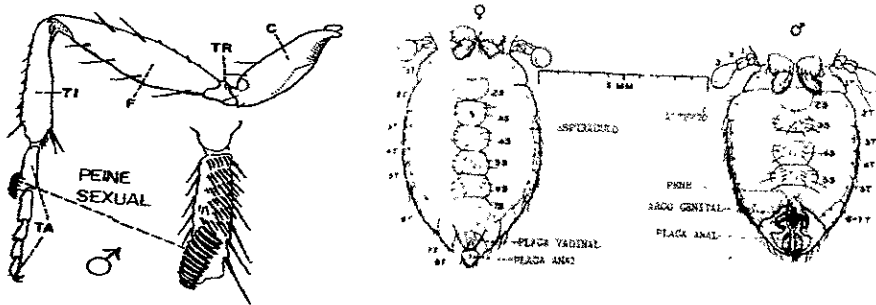


Figura 5 Diagrama de pata de mancho de Drosophila melanogaster y vista ventral del abdomen de la hembra (izquierda) y de abdomen del macho (derecha)

## 5 Pruebas de toxicidad en larvas de *Drosophila melanogaster*

Para determinar la toxicidad y la LD50 de un xenobionte, se tratan larvas de 48 horas de edad. Si se trata de un compuesto químico no volátil, la administración puede ser oral, ya sea de forma aguda o crónica.

Para los tratamientos agudos, se disuelve el compuesto en una solución de glucosa al 5% que se vierte sobre papel filtro que se coloca en frascos vacíos para que las larvas lo ingieran durante 24 horas, al cabo de ese tiempo se siembran en medio para que terminen su desarrollo. Si el tratamiento es crónico, el compuesto disuelto en la solución de glucosa se adiciona al medio de cultivo donde se siembran las larvas y se mantienen en él hasta que emergen los imagos. La diferencia entre el número de larvas sembradas para el tratamiento y el número de las sobrevivientes después de las 24 horas, o bien los adultos emergidos (tratamiento agudo o crónico respectivamente), es el valor de la toxicidad inducida y se expresa en porcentaje de mortalidad. La LD50, se obtiene administrando diferentes concentraciones del agente a probar hasta encontrar la que produzca la muerte del 50% de la muestra.

## 6 Prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster*

Desde 1945 Auerbach y posteriormente Becker en 1957, habían detectado la aparición de mosaicos o manchas clones en la cutícula de los adultos cuando se expone a larvas transheterocigóticas para marcadores fenotípicos a diferentes mutágenos (Auerbach 1945<sup>47</sup>, Becker 1975<sup>50</sup>). Mollet<sup>54</sup> y Wüglér<sup>51</sup> en 1984 proponen un nuevo método para la detección de compuestos mutagénicos empleando organismos transheterocigos para marcadores recesivos de células somáticas, la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala. Las células somáticas que se emplean en este ensayo provienen de los discos imagales mesotorácicos dorsales que dan origen a las alas, no se consideran apéndices sino estructuras cuticulares. Las alas están formadas por dos monocapas celulares de tejido epitelial: superficies dorsal y ventral. Cada una de ellas se desarrolla independientemente de la otra; por lo que se analizan cada una. Debido a que se han detectado y caracterizado mutaciones en las células del ala de *Drosophila melanogaster* que alteran la diferenciación final de las células que darán origen a los tricomas, usados como marcadores fenotípicos. Los marcadores recesivos que se utilizan son: *mwh* (pelos múltiples en el ala) y *flr*<sup>3</sup> *flare* (pelos en forma de flama). En la prueba de SMART se utilizan hembras con genotipo *mwh/mwh* (3.0.0)\* y machos *flr*<sup>3</sup>/*TM*<sup>3</sup> (3.38.8) en forma heméciga ya que el marcador *flare* en forma homéciga es letal por lo que requiere la presencia de un gen balanceador *TM*<sup>3</sup> en el cromosoma 3 y el dominante *Ser Serratia* (3.92.5) que se manifiesta como el borde discontinuo del ala (aserrado) (Lindseley, 1974)<sup>56</sup>. Al cruzarlos dan origen a larvas transheterocigóticas *mwh,+/,flr*<sup>3</sup> y *mwh / TM*<sup>3</sup>, *Ser*.

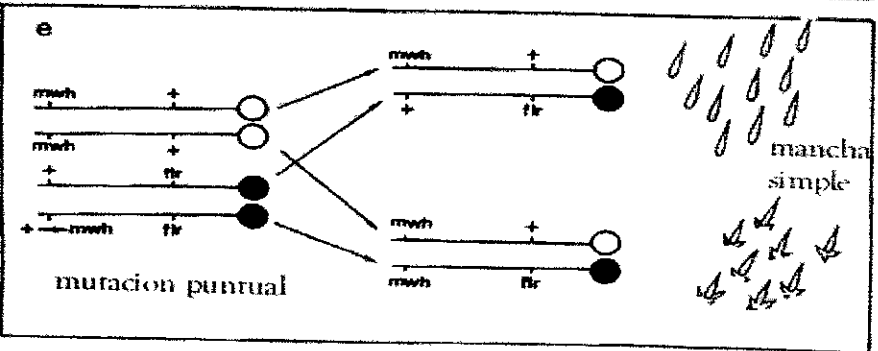
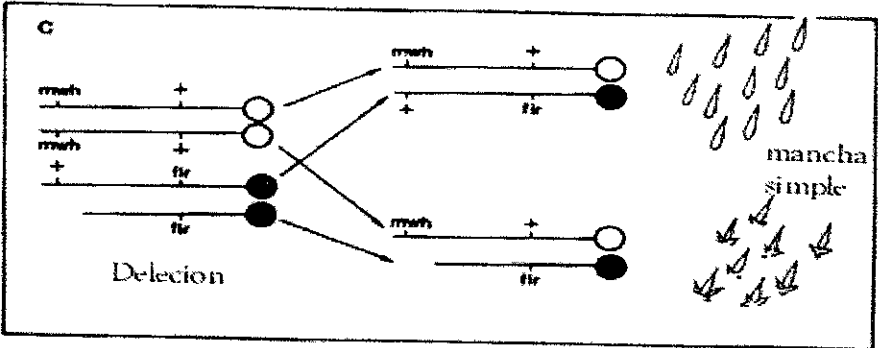
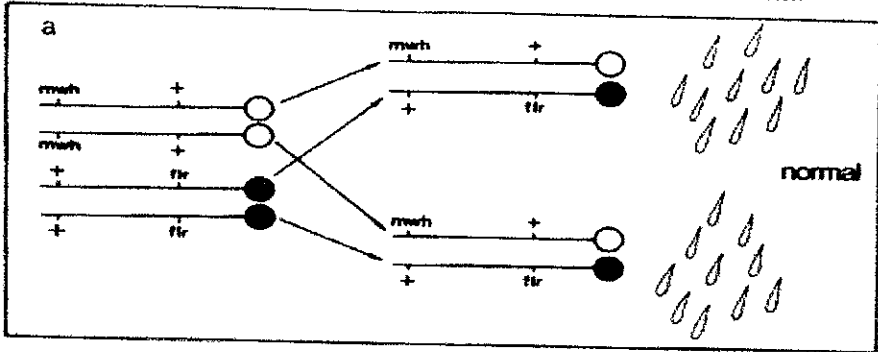
\* Ubicación del gen en el cromosoma tres



Las que son tratadas con los compuestos a probar, ya sea de forma aguda o crónica. La vía de administración puede ser oral respiratoria o por inyección. Los cambios en el material genético que se inducen se pueden detectar como clones de células con pelos múltiples o en forma de flama en las alas de los adultos sobrevivientes. La inducción de mutación puntual o delección del locus silvestre para cualquiera de los dos marcadores, se registrarán como manchas simples de fenotipo *mwh* o *flr*<sup>3</sup> (figura 6 c y e). Cuando se induce recombinación se forman manchas gemelas. La recombinación entre el marcador *flr*<sup>3</sup> localizado en el brazo izquierdo del cromosoma 3 y el centrómero; llevará a la formación de manchas dobles *mwh/flr*<sup>3</sup> (figura 6 b). Mientras que la recombinación entre los dos marcadores producirá manchas *mwh* (figura 6d). (Szabad *et al* 1983<sup>57</sup>, Graff *et al* 1984<sup>53</sup>, Wügler 1984<sup>51</sup>) El tamaño de la mancha refleja el numero de divisiones que ocurren en las células después de recibir tratamiento (apéndice II).

Con tratamientos combinados (pretratamiento, cotratamiento y postratamiento), la prueba de SMART también ha sido utilizada para evaluar la actividad antimutagénica o moduladora del daño genético de diferentes agentes como compuestos alquilantes, pigmentos de origen vegetal, metales y radiaciones. Por otra parte, con combinaciones de tratamiento y tiempos de exposición también es posible determinar la ocurrencia de algunos mecanismos genéticos, además introduciendo más marcadores se puede determinar la frecuencia de recombinación intracromosómica.

1 célula      mitosis      2 células      mancha observada



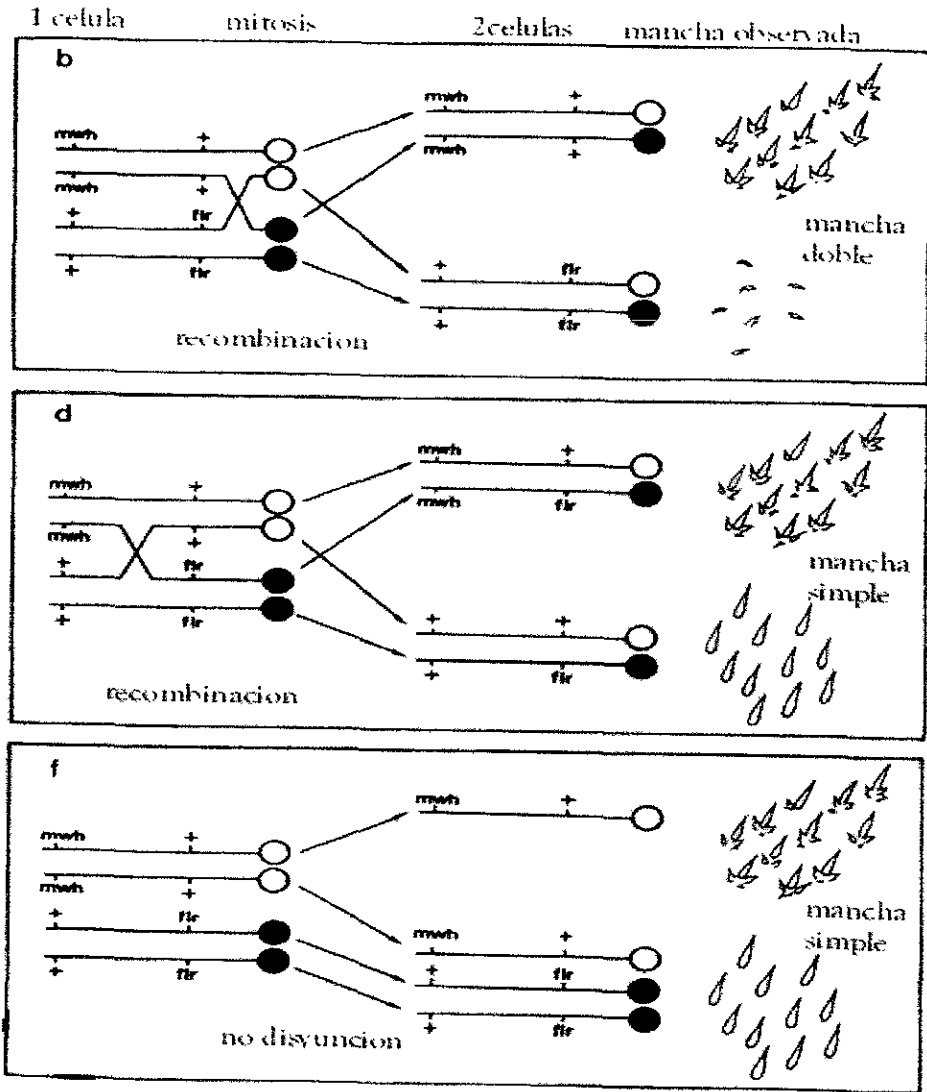


Figura 6 Eventos mutagénicos que se observan como manchas de mutación y recombinación somática SMART en ala de *Drosophila melanogaster*

## 7 Objetivo:

- ◆ Discernir si son genotóxicas las Casiopeínas I glicina , II glicina, II serina y III-E. Utilizando el sistema de prueba de mutación y recombinación somática SMART en alas de *Drosophila melanogaster* .
- ◆ Establecer si existe una relación dosis respuesta de las Casiopeínas I glicina, II glicina, II serina y III-E y su efecto genotóxico en el ensayo de mutación y recombinación somática SMART en ala de *Drosophila melanogaster*

## 8 Hipótesis

Las Casiopeínas I glicina , II glicina, II serina y III E que son compuestos que han demostrado tener actividad antineoplásica e interacción con el ADN *in vitro*, serán capaces de inducir mutación y recombinación somáticas *in vivo* en *Drosophila melanogaster*.

## 9 Metodología

### 9.1 Determinación de la toxicidad de las Casiopeínas en larvas de *Drosophila melanogaster*

Con la finalidad de determinar la toxicidad intrínseca de las Casiopeínas en *D. melanogaster*. Se administraron las Casiopeínas I glicina, II glicina, II serina , III- E y soluciones de nitrato de cobre II a larvas de *D. melanogaster* de la línea silvestre OR-R (Oregón) de 48 hr. de edad. Los fármacos se disolvieron en solución acuosa de sacarosa al 5%, en concentraciones de 0.2 mM, 0.1 mM y 0.001 mM para la Casiopeína II ser; de 1 mM, 0.1 mM, 0.01 mM, 0.001 mM de las Casiopeínas I glicina, II glicina y III-E, y de 1 mM hasta  $10^{-6}$  mM para el nitrato de cobre II; el tratamiento dado fue agudo (24 hr.) por vía oral. Para ello se recolectaron huevecillos de la línea silvestre oregón (OR-R), que se incubaron a 25 °C para obtener larvas de 48 hr., que se retiraron del medio lavándolas por gradiente de densidad con solución de sacarosa al 5%. Se colocaron en frascos , que contenían papel filtro saturado con las soluciones a probar durante 24 hr. Al término del periodo se contó el número de larvas vivas obteniendo así el porcentaje de sobrevivencia que indica la toxicidad de los compuestos probados.

## 9.2 Ensayo de mutación somática y recombinación genética SMART

Para llevar a cabo el ensayo se aíslan hembras vírgenes de la línea *mwh* y machos de la línea *fir<sup>3</sup>/TM<sup>3</sup>,Ser*, se colocan en inanición hembras y machos por aproximadamente una hora. A las hembras se les permite ovipositar en medio regular (Apéndice I-A) durante cuatro horas. Los huevecillos así obtenidos dan origen a las larvas transheterocigóticas.

A las 48 hr. de haber eclosionado las larvas se retiran del medio de cultivo por gradiente de densidad con una solución de sacarosa al 5%. Se aíslan grupos de 100 larvas y se depositan en tubos viales con 5 g de medio instantáneo (Carolina Biological Supply Co.) hidratado con las soluciones correspondientes de Casiopeínas disueltas en solución de sacarosa al 5%.

Las concentraciones utilizadas fueron  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , y  $10^{-5}$  mM de la Casiopeína I glicina [Cu(4,7-difenil-1,10 fenantrolina)(glicina) NO<sub>3</sub>], Casiopeína II glicina [Cu(4,7-dimetil-1,10fenantrolina)(glicina)NO<sub>3</sub>], Casiopeínas II serina [Cu(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(serina)NO<sub>3</sub>], y Casiopeína III-E [Cu(4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(acetilacetato)NO<sub>3</sub>] Abreviadas: I(gli), II(gli), II(ser) y III-E respectivamente. Los cultivos se incubaron a 25°C. Una vez que los adultos emergieron, se depositaron en frascos viales de vidrio con alcohol al 96% (Graff, Wügler, 1983)<sup>51y52</sup>. Las alas se disectaron empleando pinzas de punta muy fina y aguja de disección, se montaron con solución de Faure (Apéndice I-B) en un portaobjetos una vez seca la solución, las preparaciones se cubren con cubreobjetos. Poniendo peso sobre estas mediante pequeños cuadros de acero y hasta que secan las preparaciones.

Las preparaciones se examinaron al microscopio óptico a 400 X. Con la finalidad de facilitar la observación se toman en cuenta las divisiones naturales del ala dadas por las venas y a cada región se le asigna una letra (figura 7) (Graff, 1985)<sup>52</sup>.

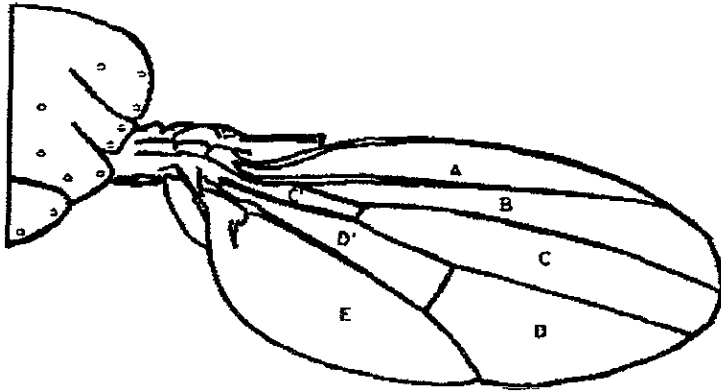


Figura 7 Ala de *Drosophila melanogaster* dividida por regiones de la A-E

Cada una de las células de las alas normalmente tiene un “pelo” (tricoma). Si los marcadores genéticos *mwh* y *flr<sup>3</sup>* se expresan, la diferenciación final de los tricomas será diferente al fenotipo silvestre (figura 8,a). Las células que se obtienen mostrarán el genotipo alterado, la mancha que observamos es un clon de la célula mutante.

### 9.2.1 Clasificación de las manchas

Las manchas que se observan pueden mostrar el fenotipo: *mwh* muestran tres o más pelos en lugar de uno por célula (figura 8 b), Flare muestra pelos gruesos y cortos en forma de flama. El criterio para clasificar las manchas de las alas es el sugerido por Graff<sup>51</sup> chicas, grandes o gemelas dependiendo del número de células afectadas 1- 2 las primeras; 3-4, 5-8, 9-16, 17-32 o más las segundas y gemelas cuando el clon presenta células tanto de fenotipo *mwh* como *flr<sup>3</sup>*.



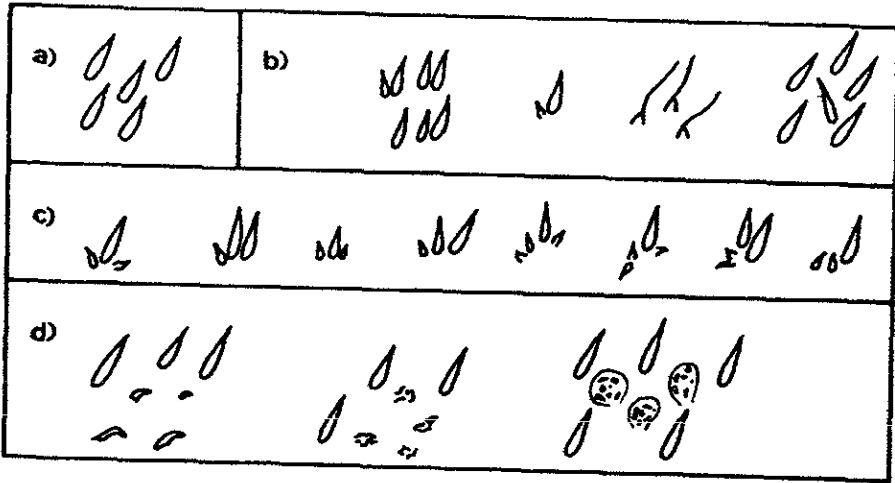


Figura 8 Tricomas de las alas. a) normales, b) tricomas derivados del fenotipo de *mwh* y *flr*, c) configuración indicativa *mwh*. d) manifestación de *flr*

## 10 Resultados

### 10.1 Toxicidad en larvas de *Drosophila melanogaster*

**Tabla II Toxicidad en toxicidad de la Casiopeína I glicina**

Tratamiento	% de larvas vivas	$\chi^2_c \alpha 0.05$
testigo(sacarosa 5%)	67.5	
cas I 1 mM	52.5	3.3333
cas I 0.1 mM	65	0.0926
cas I 0.01 mM	65	0.0926
cas I 0.001 mM	68.3	0.0095

\*significativo  $p > 0.05$  con un  $\chi^2 = 3.84$  de tablas

**Tabla III Toxicidad de la Casiopeína II glicina**

Tratamiento	% de larvas vivas	$\chi^2_c \alpha 0.05$
testigo(sacarosa 5%)	67.5	
cas II 1 mM	65	0.0926
cas II 0.1 mM	63	0.3000
cas II 0.01 mM	65	0.0926
cas II 0.001 mM	66.6	0.0120

\*significativo  $p > 0.05$  con un  $\chi^2 = 3.84$  de tablas

**Tabla IV Toxicidad de la Casiopeína II serina.**

Tratamiento	% de larvas vivas	$\chi^2_c \alpha 0.05$
testigo(sacarosa)	80.83	
cas II 0.2 mM	87.5	0.5504
cas II 0.1 mM	71.66	1.0403
cas II 0.001 mM	77.5	0.1372

\*significativo  $p > 0.05$  con un  $\chi^2 = 3.84$  de tablas

**Tabla V Toxicidad de la Casiopeína III-E**

Tratamiento	% de larvas vivas	$\chi^2$ $\alpha$ 0.05
testigo(sacarosa 5%)	70	
cas III 1 mM	44.16	9.3623*
cas III 0.1 mM	42.5	10.8036*
cas III 0.01 mM	71.66	0.0394
cas III 0.001 mM	59.166	1.6787

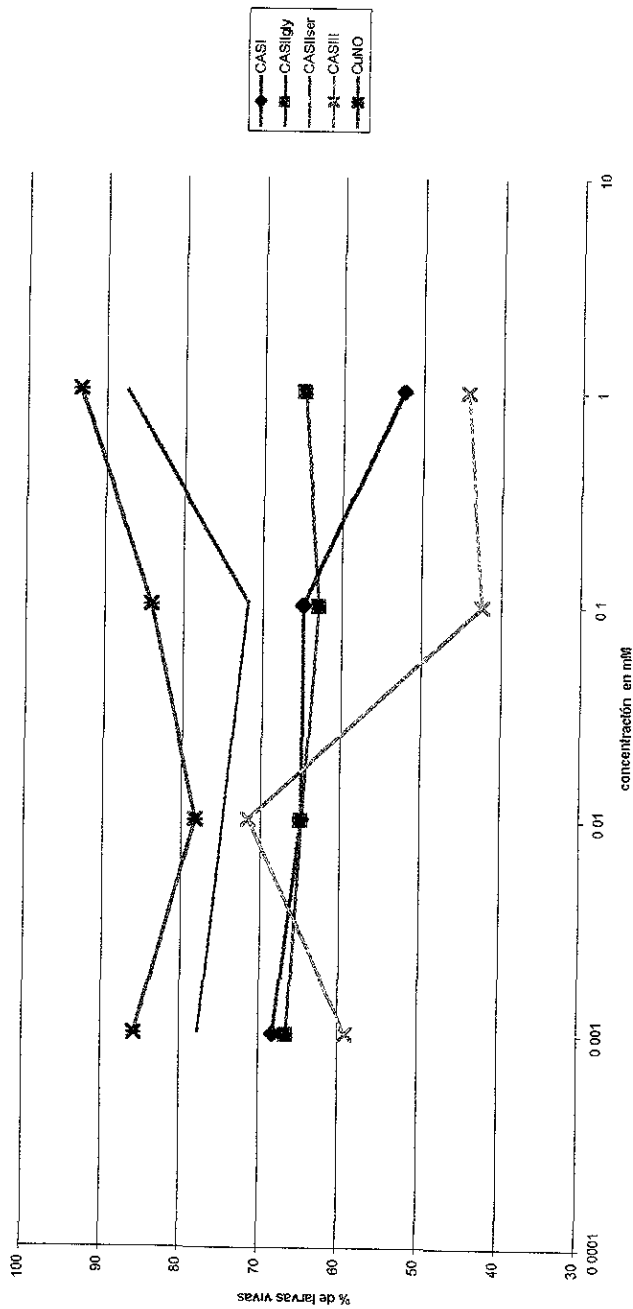
\*significativo  $p > 0.05$  con un  $\chi^2 = 3.84$  de tablas

**Tabla VI Toxicidad de Nitrato de cobre II**

Tratamiento	% de larvas vivas	$\chi^2$
Testigo (sacarosa 5%)	93.33	
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM	93.33	0.0000
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-1}$ mM	84.16	0.9010
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-2}$ mM	78.33	2.4108
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-3}$ mM	85.83	0.6027
Testigo sacarosa 5%	94.16	
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-3}$ mM	85	0.8911
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-4}$ mM	76.67	3.2487
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-5}$ mM	95	0.0075
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $10^{-6}$ mM	86.66	0.5974

\*significativo  $p > 0.05$  con un  $\chi^2 = 3.84$  de tablas

**Gráfica 1 . Curva Dosis Respuesta de las Casiopeinas y el nitrato de cobre (II) del ensayo de Toxicidad en larvas de *Drosophila melanogaster***



## 10.2 Resultados de la prueba de Mutación y recombinación somática

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa SMART de análisis estadístico que aplica la prueba estadística de  $\chi^2$  con una probabilidad del 95% con base a la metodología sugerida por Frei (Frei, et al. 1988)<sup>58</sup>.

**Tabla VII Efecto de la Casiopeína I glicina en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster***

Tratamiento	No de alas	Manchas						Frecuencia Total de Manchas	
		Chicas		Grandes		Gemelas			
		Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.
Testigo	40	0.37	15	-	-	-	-	0.37	15
1 mM	40	0.55	22	0.25	10	0.25	10	0.60	42*
0.1 mM	40	0.47	19	0.10	4	-	-	0.52	23
0.01 mM	40	0.37	15	0.10	4	-	-	0.41	19

\*significativo determinado estadísticamente por el programa SMART a  $p > 0.05$ , (Grafica 2)

**Tabla VIII Efecto de la Casiopeína II glicina en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster***

Tratamiento	No de alas	Manchas						Frecuencia Total de Manchas	
		Chicas		Grandes		Gemelas			
		Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.
Testigo	120	0.28	34	0.01	1	0.01	1	0.31	36
1 mM	120	0.54	65	0.07	8	0.03	4	0.65	77*
0.1 mM	120	0.33	40	0.06	7	0.008	1	0.40	48
0.01 mM	120	0.28	34	0.06	7	0.008	1	0.35	42

\*significativo determinado estadísticamente por el programa SMART a  $p > 0.05$ , (Grafica 3)

**Tabla IX Efecto de la Casiopeína II serina en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster***

Tratamiento	No de alas	Manchas						Frecuencia Total de Manchas	
		Chicas		Grandes		Gemelas			
		Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.
Testigo	40	0.28	11	0.01		0.01	1	0.31	12
1 mM	40	0.50	20	0.15	6	-	0	0.65	26*
0.1 mM	40	0.62	25	0.05	2	-	0	0.67	27*
0.01 mM	40	0.55	22	0.07	3	0.05	1	0.67	26*

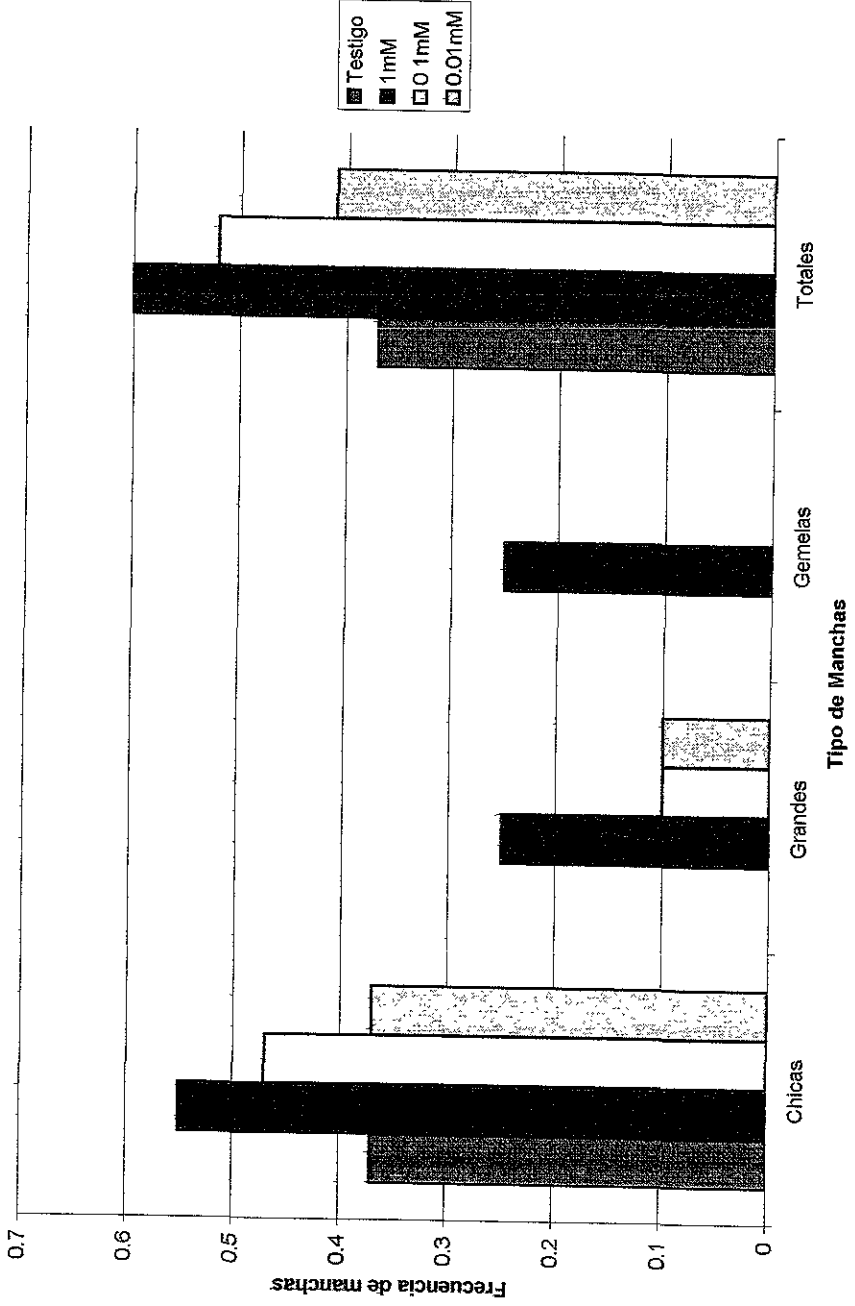
\*significativo determinado estadísticamente por el programa SMART a  $p > 0.05$ , (Grafica 4)

**Tabla X Efecto de la Casiopeína III-E. en células somáticas del ala de *Drosophila melanogaster***

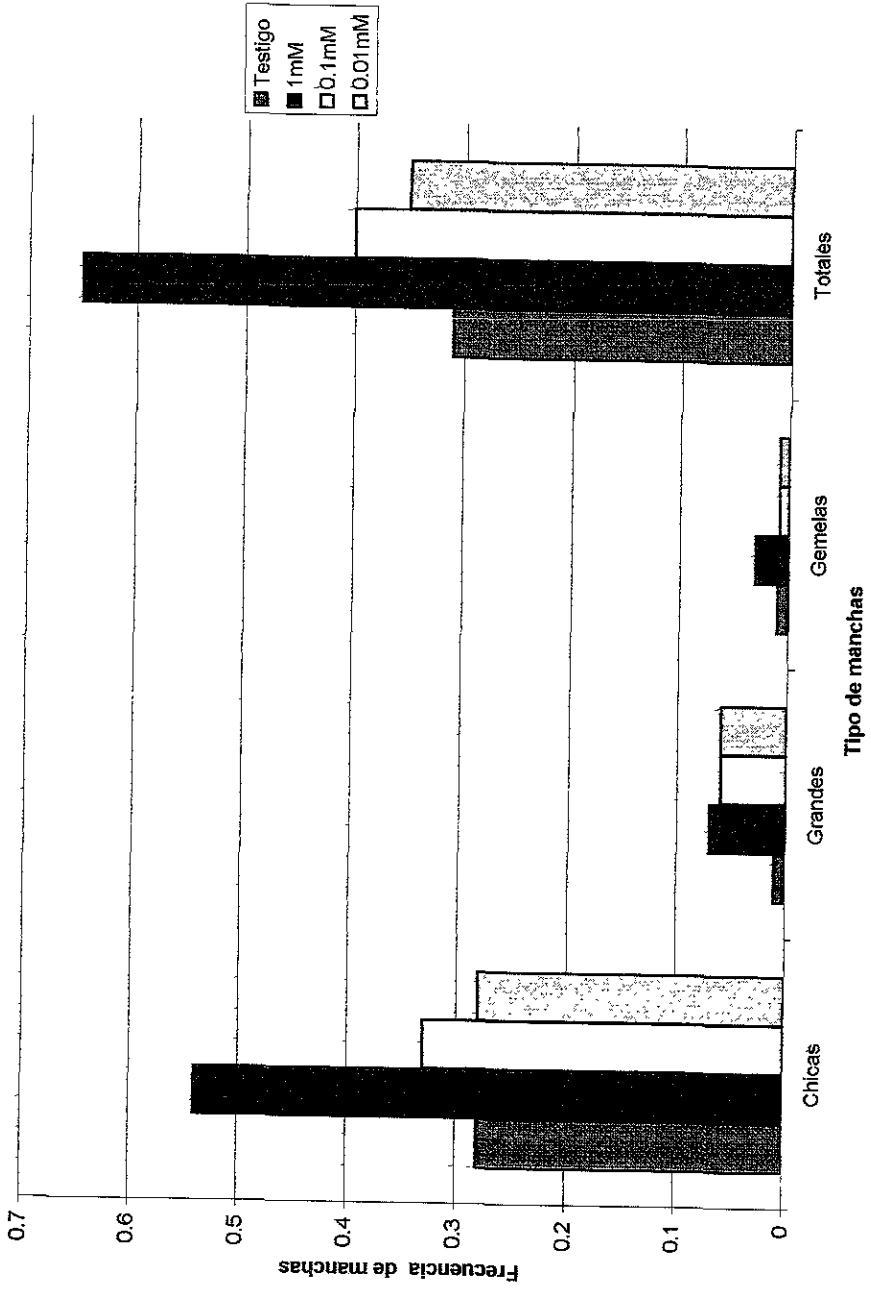
Tratamiento	No de alas	Manchas						Frecuencia Total de Manchas	
		Chicas		Grandes		Gemelas			
		Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.	Frec.	Num.
Testigo	40	0.27	11	0.02	1	-	-	0.30	12
1 mM	40	0.55	22	0.1	4	0.02	1	0.67	27*
0.1 mM	40	0.57	23	0.1	4	0.02	1	0.70	28*
0.01 mM	40	0.60	24	0.1	4	-	0	0.70	28*

\*significativo determinado estadísticamente por el programa SMART a  $p > 0.05$ , (Grafica 5)

Gráfica 2. Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeina I glicina en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*

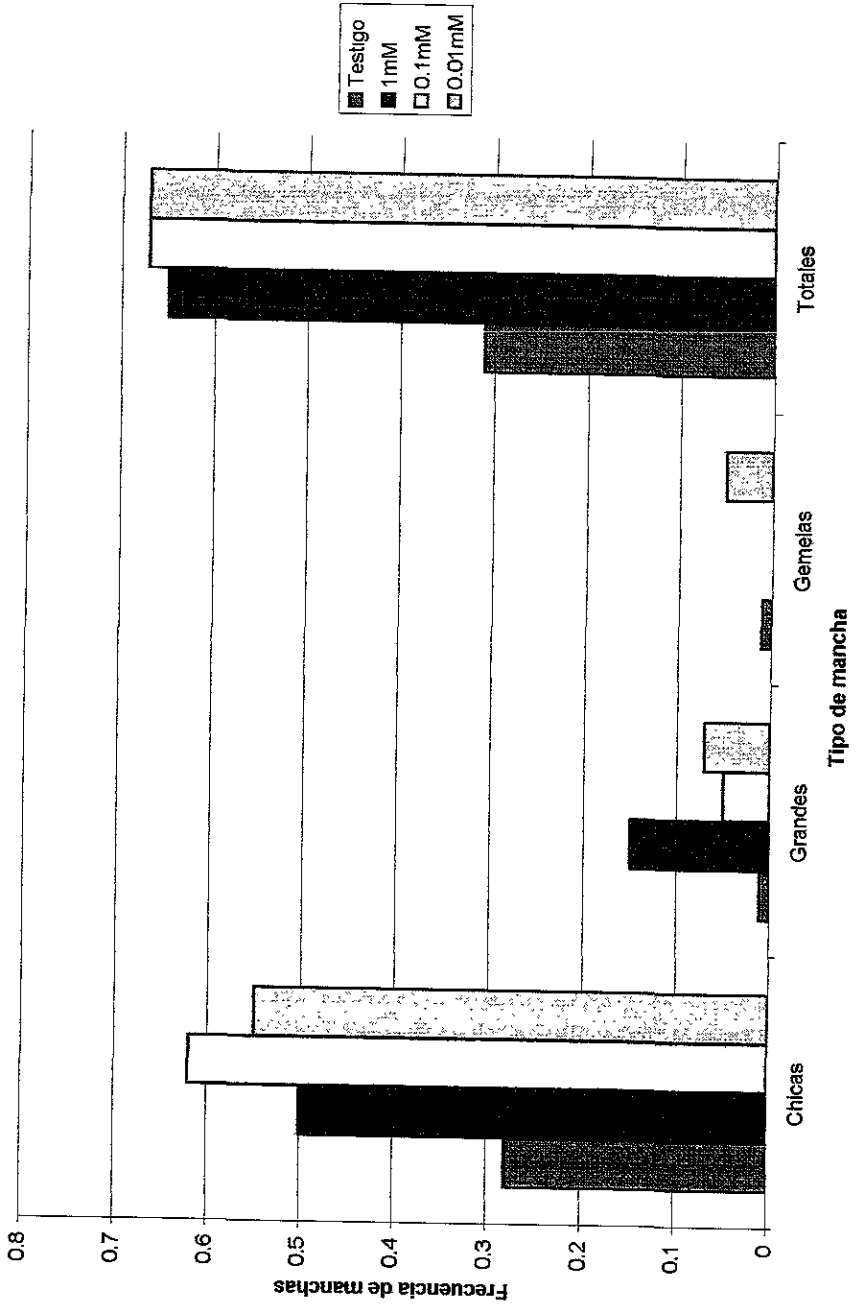


Gráfica 3. Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeina II glicina en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*

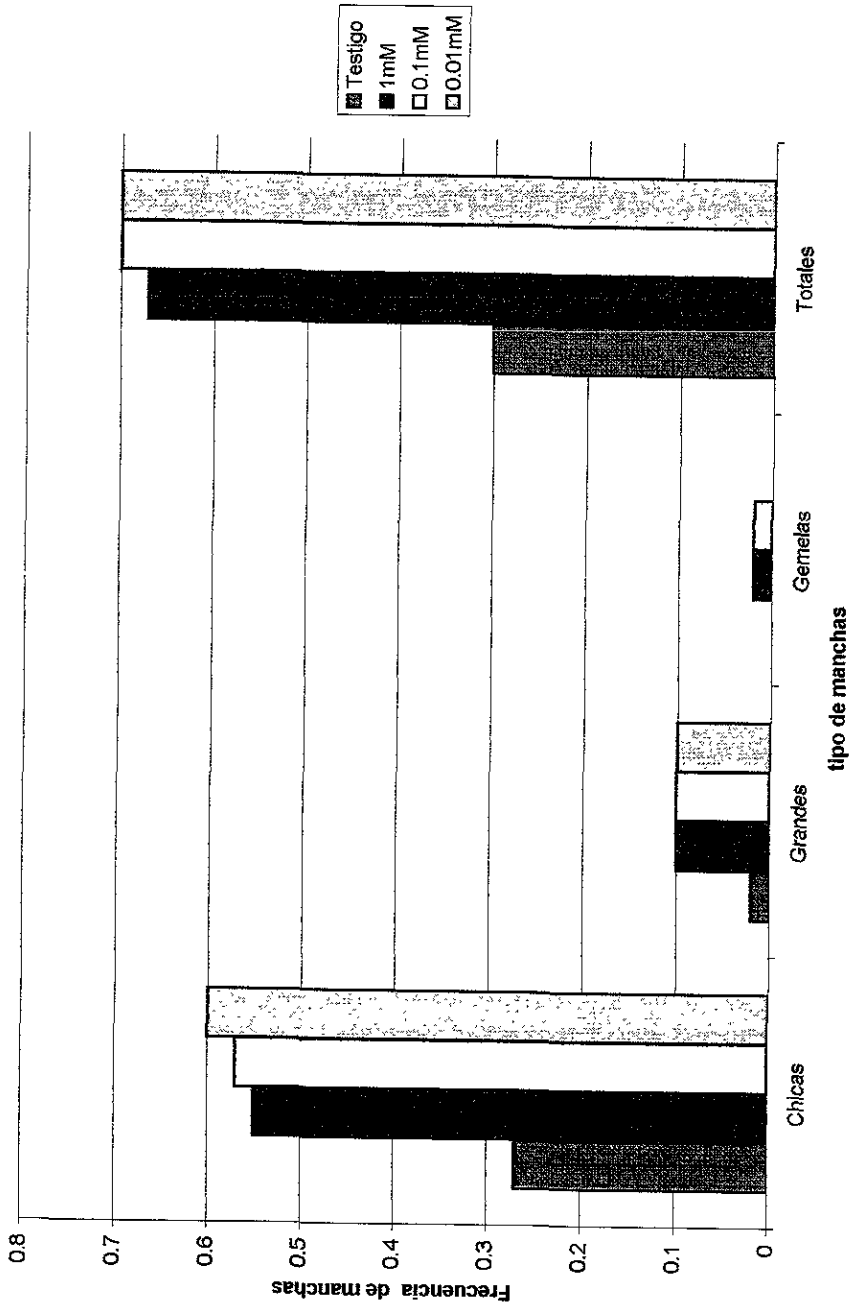




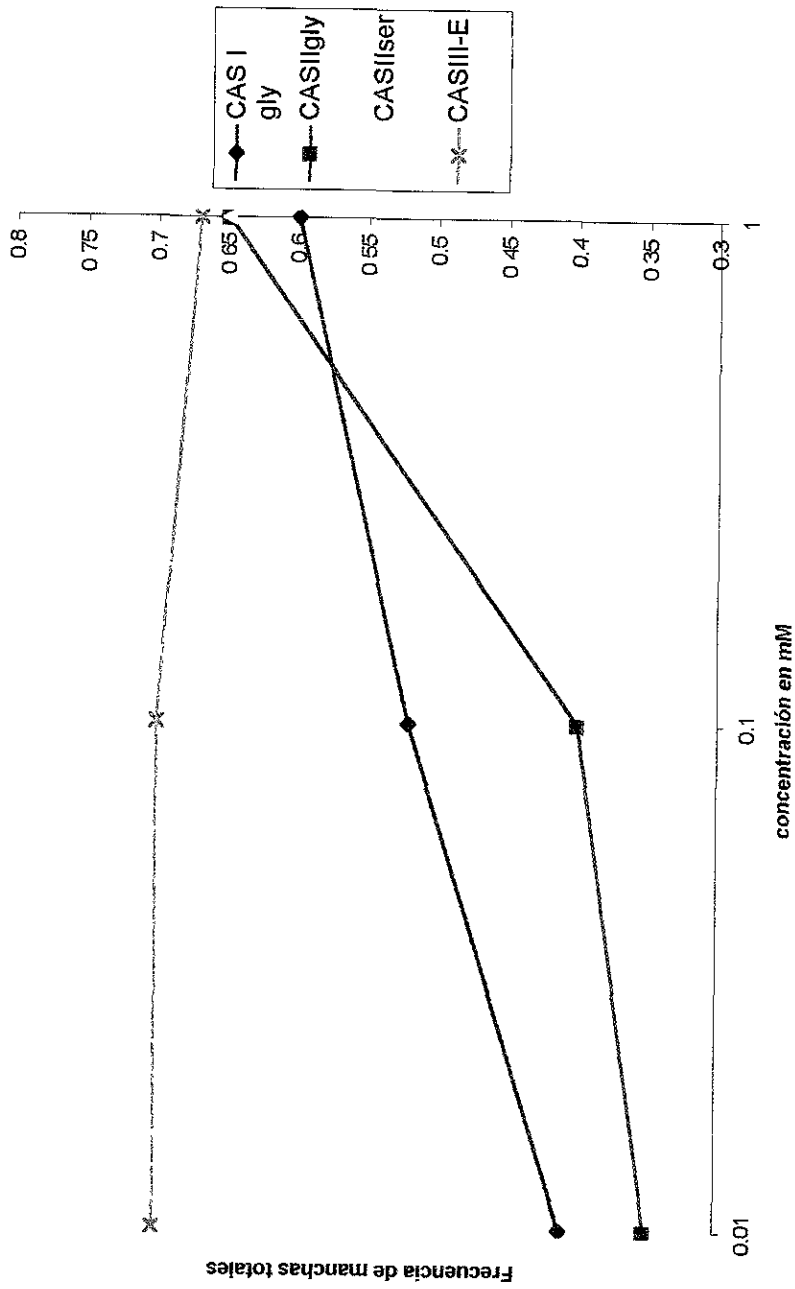
Gráfica 4. Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeina II serina en el ensayo de SMART en ala de *Drosophila melanogaster*



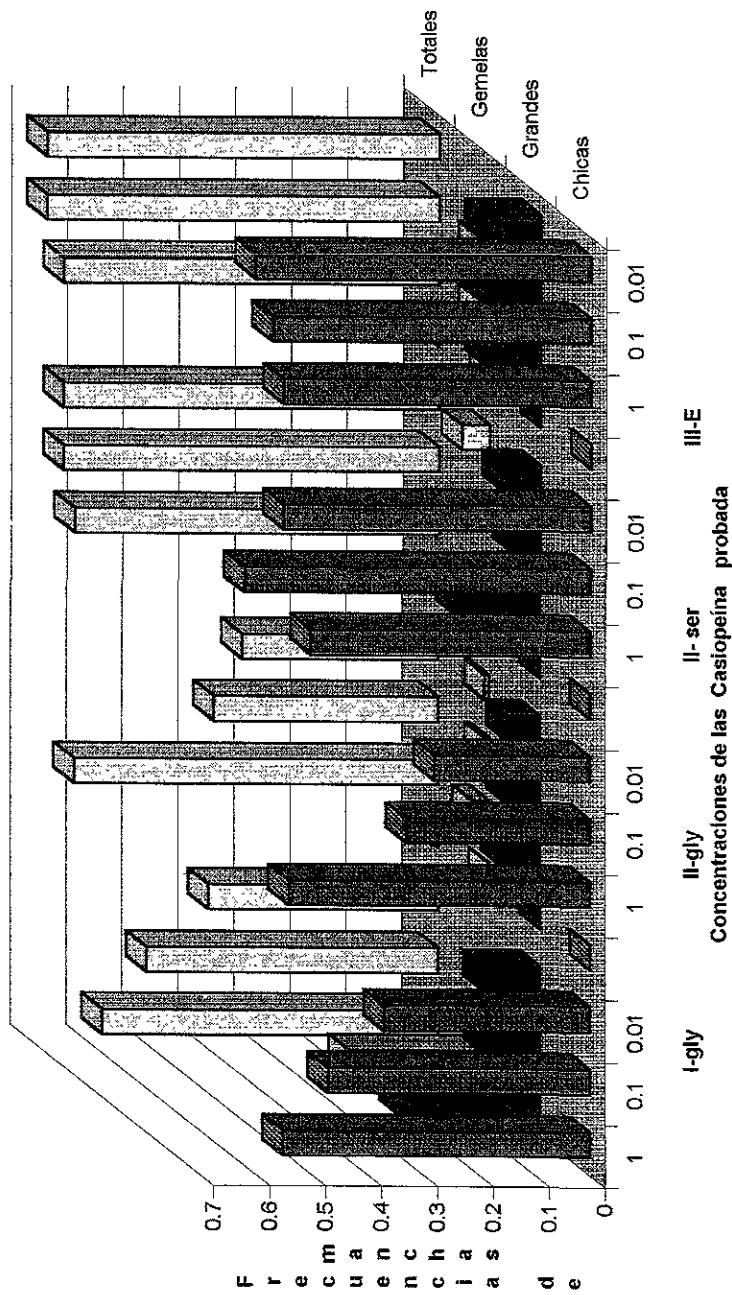
Gráfica 5. Frecuencia de manchas inducidas por el tratamiento con Casiopeína III-E en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*



Gráfica 6. Comparación de la relación dosis- respuesta de las Casiopeinas probadas en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*



Gráfica 7. Comparación de la frecuencia de inducción de manchas por los tratamientos dados con las Casiopeínas en el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*



## 11 Discusión de Resultados

Al comparar el número de larvas vivas con respecto al testigo y aplicando la prueba estadística de  $\chi^2$  con una confianza del 0.95, observamos que las concentraciones más altas de Casiopeína I- glicina produjo genotoxicidad estadísticamente significativa así como las concentraciones 1mM y 0.1 mM de Casio peina III-E probadas, sin embargo las Casiopeínas II- glicina y II- serina así como el nitrato de cobre (II) no indujeron toxicidad significativa en las larvas. No se observa una relación dosis respuesta (concentración-sobrevida) (gráfica 1). La toxicidad de estos compuestos nos permite obtener un número suficiente de individuos vivos para llevar a cabo el ensayo de SMART.

El número total de manchas que se observó en los grupos tratados en el ensayo SMART, es la suma de los eventos mutagénicos y recombinagénicos que la prueba puede detectar. Podemos observar que en los grupos tratados con Casiopeínas I glicina, II glicina, II serina y III-E hay un incremento en el número de eventos mutagénicos en comparación con los grupos testigo.

En el tratamiento con Casiopeína I glicina se observa una relación dosis respuesta. Con un incremento significativo en la frecuencia de las manchas chicas y grandes, sin embargo solo se observaron manchas gemelas en la concentración de 1 mM. Lo que sugiere que a concentraciones de 1 mM la Casiopeína I glicina (gráfica 2) puede ser recombinagénica además de genotóxica. El tratamiento con Casiopeína II glicina (gráfica 3) mostró también una relación dosis respuesta en los diferentes tipos de manchas que se observan. En todas las concentraciones se observa la aparición de manchas gemelas, siendo significativo el aumento de la frecuencia en la concentración de 1 mM.

Mientras que la Casiopeína II serina (gráfica 4) no tiene una relación dosis respuesta, con un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de las manchas en la concentración de 0.01 mM y la Casiopeína III-E (gráfica 5) indujo un aumento significativo en la frecuencia de las manchas en comparación con el testigo, sin embargo, no hay una diferencia entre los grupos tratados con las diferentes concentraciones.

En la gráfica comparativa de la dosis respuesta (gráfica 6) de las Casiopeínas probadas se observó que la Casiopeína I glicina [ Cu( 4,7-difenil-1,10 fenantrolina)(glicina)NO<sub>3</sub>] y la Casiopeína II glicina [ Cu( 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(glicina)NO<sub>3</sub>] muestran una relación dosis respuesta positiva mientras que las Casiopeínas II serina [ Cu( 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(serina)NO<sub>3</sub>] y III-E [ Cu( 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina)(acetilacetionato)NO<sub>3</sub>] no se observa una relación dosis respuesta, esto es indicativo de que el donador O-N influye en la actividad mutagénica del compuesto. Siendo el aminoacidato glicina, la parte de la molécula que le confiere mayor actividad mutagénica en las células del ala de *D. melanogaster*. Al comparar entre si a las Casiopeínas I-glicina y II glicina observamos que difieren en el donador N-N, siendo 4,7-difenil-1,10 fenantrolina para la primera y 4,7-dimetil-1,10 fenantrolina para la segunda sin embargo la diferencia en la respuesta total no es significativa por lo que estos substituyentes no tienen gran influencia en la actividad mutagénica en este modelo de prueba. Cuando comparamos los resultados obtenidos con los diferentes compuestos se observó que la Casiopeína I glicina es más recombinagénica, en concentración de 1 mM, sin embargo la Casiopeína II glicina es recombinagénica desde concentraciones de 0.01 mM al igual que las Casiopeínas II-serina y III-E (gráfica 7).

Por lo que podemos sugerir que los sustituyentes dimetil y difenil influyen directamente en la actividad recombinagénica siendo el dimetil más efectivo en la inducción de recombinación. Por otra parte en los ensayos con Casiopeína III-E el aumento de la frecuencia de manchas gemelas, es muy similar al de la Casiopeína II- serina lo que la hace igualmente recombinagénica. Al comparar la frecuencia de manchas gemelas indicadoras de recombinación somática de las Casiopeínas II serina y II glicina se observó que la Casiopeína II glicina es capaz de inducir un mayor número de eventos recombinagénicos que la Casiopeína II serina. Esto coincide con los resultados que se obtuvieron en el estudio del potencial recombinagénico *in vitro* en células SPD8 con las Casiopeínas II serina y II glicina (Tenorio,1999)<sup>59</sup> donde se encontró que estas inducen recombinación genética homóloga, con un índice de recombinación\* mayor para la Casiopeína II glicina (de 3) que para la II serina (de 2) que son muy cercanos al índice de recombinación de la Mitomicina C (de 4) lo que puede reducir en la clínica la probabilidad de inducción de tumores secundarios o refractarios al tratamiento con Casiopeínas, que pueden ser causados por el alto grado de mutaciones sufridas en el genoma de las células cancerosas.

\* El índice de recombinación se calcula en base a la frecuencia de reversiones que presentan las células a un 50% de sobrevivencia (IC50) y la frecuencia de reversiones a un 100% de sobrevivencia (IC100).

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

## 12 Conclusiones

Con el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en el ala de *Drosophila melanogaster in vivo* podemos decir que las Casiopeínas probadas son capaces de interaccionar con el material genético ya que indujeron *mutación* y *recombinación* somáticas.

La relación dosis-respuesta en la inducción de efectos genotóxicos de las Casiopeínas I gli y II gli indica que existe una relación estructura actividad.

Es necesario continuar probando Casiopeínas de las familias I, II y III con la finalidad de corroborar la relación estructura- actividad (*interacción* con el ADN).



### 13 Bibliografía:

1. Lee Chi-Jen, **Development and Evaluation of Drugs**, CRC Press, U.K. 1993.
2. Bush H., **Preclinical methodology for the selection of anticancer agents**. *Methods of Cancer Research*, V 1:7,1967
3. Gerand G, Macdonald and Abott, **Protocols for in vivo screening systems**, National Cancer Institute, USA, 1987.
4. Ruiz- Ramírez Lena, **Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos tipo I**, patente de invención en trámite, SECOFI 18801, P.I. (1990), enero 26 (1994) no 172967.
5. Ruiz- Ramírez Lena, **Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos tipo II**, patente de invención en trámite, SECOFI 18801, P.I. (1990), dic. 9 (1993) no 172248.
6. Ruiz- Ramírez Lena, **Process to obtain new complexes to be used as anticarcerigenic agents. Type A.** . U.S. Patent application serial No 07/628,843., Ap 21 (1992) Number 5, 107, 005.
7. Ruiz- Ramírez Lena, **Process to obtain new complexes to be used as anticarcerigenic agents. Type A.** . U.S. Patent application serial No Re.35, 458, feb 18 (1997)
8. Wright, **The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis**, *Mutation Research*, V 25: 215-241,1980.
9. Brusick, D., **Principles of Genetic Toxicology**, Plenum Press, New York, USA 1987, pp 284.
10. Loomis T.A., Hayes W.A., **Loomis essentials of Toxicology**, 4th edition, Academic Press, USA, 1994

11. King R.C., Standsfield W.D., **A dictionary of genetics**, 5th edition, Oxford press, USA, 1997
12. Russell P.J., **Genetics**, 3rd Edition, Harper Collins Publishers, USA, 1992.
13. Hartl D.L., **Genetics**, 3rd edition, Jones and Bartlett Publishers, U.K., 1994.
14. William P., Watson, Bleasdale C., Golding B., **Chemicals and Cancer: estimating the risk**, Chemistry in Britain, august 1994, pp 661-664.
15. Shawn I., Jones H., **Mechanisms of non -genotoxic carcinogenesis**, Tips, march 1994, V 15: 89-93.
16. Díaz-Perches R., **El impacto de la patología en el tratamiento del cáncer**, Oncología/ Toxicología, Libro 5, parte C, ed. Pfizer.
17. Dimitros, Trichopoulos, **What, Causes Cancer?**, Science, 1999. [www.science.com](http://www.science.com)
18. Ruiz A.L. Villar C.L., Gasque S.L., **Estudio estructural de las Casiopeínas** Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
19. Gasque L., Medina D. G., Moreno E.R., Ruiz -Ramírez L., **((Salicylaldehyde-O,O)(nitrate)(5,6-dimethyl -1.10-phenanthroline N,N) Cooper (II)**, Acta Cryst., C55 (1999) 1063-1065.
20. Gaque L, Medina D., Moreno E. R., Ruiz-Ramírez L., **Cu-O stretching frequency correlations with phenanthroline mixed chelate complexes**. Inorganica Chemistry Acta, 2288, N1 (1999) 106-111.
21. Gasque L., Ruiz-Ramírez L., y Moreno-Esparza R., **“Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1,10 phenanthroline”**, Journal of inorganic Biochemistry 48 (2) (1992) 121.

22. Romero L. Márquez A., Gracia M.I., **Estudio de la estabilidad de las Casiopeínas II y III en soluciones filológicamente compatibles.** Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
23. Macias R.L., Gracia M.I., Rico M.H., **Evaluación Preclínica de fármacos con actividad antineoplásica potencial.** Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
24. Ruiz A. L., Ferre S. G., Gracia M. I., **Cernimiento antineoplásico *in vivo* de compuestos de coordinación con cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino.** Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
25. Ferrer sueeta G., Ruiz-Ramírez I., Radi R., **Ternary cooper complexes and manganese (III) tetrakis ( 4-benzoic acid)(porphirin) catalyze peroynitrite-dependent nitration of aromatics,** J. of Chemical Research in Toxicology, (1997) 10, 12, 1338-1344.
26. Dobrota M, Vizcaya R.A.,Rivero-Müller A., Ruiz-Ramírez L., Kelland L.R., Orr R.M., **L1210 and CH1 cells treated with novel cooper-based Anticancer Compound-Casiopeína II die by apoptosis.**, Anticancer Research (1998) 18: 4936.
27. Cirigo L C, **Estudio de la Interacción de la Familia de las Casiopeínas I y II con el ADN,** Tesis de Maestría , México, abril 1996.
28. Vizcaya R.A., Paredes P.J., Mora G.I., **Farmacocinética Básica y eficacia de la Casiopeína II en el tratamiento de perros con tumor venéreo trasmisible.** Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
29. Lezama-Carrasco, Ruiz R.,De la Rosa D., **Estudio radiofarmacocinético de Casiopeínas,** Tercera Jornada de trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.

30. Rendón G.E., Tenorio M. E., **Determinación Farmacocinética de las Casiopeínas II y III en ratón, por absorción atómica**, Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
31. Vizcaya R.A., Rivero-Müller A., Howarth J.A., Dobrota M., **Casiopeína II-pharmacokinetics, toxicology and *in vitro* biological effects**. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1998.
32. De la Rosa D., Maycotte P.,Salgado A., **Estudio de Subproductos del metabolismo de Casiopeínas *in vivo***. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
33. Vizcaya R.A., Rivero-Müller A., Howarth J.A., Dobrota M., **Haematological response after administration of the novel cooper based anticancer agent Casiopeína II**. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
34. Dobrota M, Vizcaya A., Rivero A., **Haematological efectos of Casiopeína II: a novel copper-based anticancer agent**, American Ass. For Cancer Research, (1998) 39:328.
35. Fuentes N.I., Ruíz Ramírez L., Tovar-Tovar A., Rico M., H., Gracia M.I., **Development and validation of liquid chromatographic method for Casiopeína III-I in plasma** J. of Chromatography B., (2000), in press.
36. Tinoco M.M., Candanosa A.E., Gracia M.I. **Administración de Casiopeína I por vía intraperitoneal Estudio anatomo histológico en ratones**, Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
37. Dobrota M., Vizcaya A., Rivero A., **Oxidation of lipoproteins**, Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
38. Romero A.A., Sumano L.H., **Determinación de la toxicidad de la Casiopeína I en corazón aislado de conejo**. Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.

39. Quiroz R. G., **Toxicidad Aguda de Casiopeína II pro administración intravenosa en ratones, estudio anatomo histológico**, Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
40. Rivera H., Gracia M., Rovira I., Tinoco M., Sumano L., Macias R., Ruiz A., **Determinación de dosis letal 50 aguda (DL50) de la Casiopeína III y V en rata y ratón por vía intravenosa e intraperitoneal y búsqueda de terapia adyuvante**. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
41. Gracia M.L., Duque R. M., **Estudio comparativo del efecto de los sustituyentes periféricos en la estructura de las Casiopeínas empleando diversos modelos *in vitro* e *in vivo***, Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
42. Bravo G., Ruiz A., Graci M., Tinoco M., Ferrer S., **Evaluación antineoplásica de compuestos de coordinación de cobre (Casiopeínas) en modelo tumoral murino**. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México mayo 1998.
43. Cano S.P., Breña V.M., **Genotoxicidad de Casiopeínas y Sustancias análogas**, Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
44. Cano S., Breña V., y Serment G., **Genotoxicidad de Casiopeínas-Parte II. Estudios en Leucocitos Humanos**. Tercera Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, mayo 1998.
45. Cruz R., Gracia M., Ruiz A., De la Rosa D., Fattel S., Villa S., **Evaluación del efecto de Casiopeínas sobre el ADN mediante el empleo del modelo de cultivo primario de hepatocitos de rata**, Memorias del VI congreso conjunto de las Sociedades Mexicanas de Genética y de Toxicología Genética, Guadalajara Jal. Septiembre 1999.
46. Tovar T. A., Ruiz A.L., **Reactividad de la familia de la Casiopeína II y III Frente a algunas moléculas constituyentes del ADN ( bases Púricas y Pirimidicas, así como**

- algunos de sus derivados) Segunda Jornada de Trabajo en Casiopeínas, México, abril 1996.
47. Auerbach, **The problem of chromosome rearrangements in somatic cells of *Drosophila melanogaster***, Proc. R. Soc. Edinburgh, V B62 :120-127,1945.
  48. Wilkins A.S., **Genetic analysis of animal development**. Editorial John Wiley and sons, N.Y. USA, 1985.
  49. Demerec M., Kaufmann B.P., **Introducción a la genética y citología de *Drosophila melanogaster***, Instituto Nacional de Energía Nuclear, México 1975.
  50. Becker, **X'Ray and Tem induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*: Unequal and sister strand recombination**. Molec, Gen. Genet, V 138:11-24 ,1975.
  51. Wügler F.E., Graf U. **Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster***, Environmental Mutagénesis V 6:153-188, 1984.
  52. Wügler F.E., Graf U. Frei, **Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster***, Progress in Mutation Research, V 5:325-340,1985.
  53. Graff, U., Joun H., Katz A.J. Frei, Wügler, **A pilot study on a new *Drosophila* spot test**. Mutation Research V 120: 233-239,1983.
  54. Mollet P., Szabad J., **Induction and detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds**. Mutation Research, V 25: 421-424,1974
  55. Nöthiger R., **Sucrose density separation: A method for colleting large number of *Drosophila* larvae.**, Drosophila Information Service, V 45: 177, 1970.
  56. Lindsley D.L., Grell E.H., **Genetic Variation of *Drosophila melanogaster***, Carnegie Institution of Washington, USA, 1974

57. Szabad J.I., SOOS, Polgar G. y Hejjag. **Testing the Mutagenicity of Malonaldehyde and Formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and Sex Link Recessive Lethal Test**, Mutation Research V 113:117-133, 1983.
58. Frei H., Würzler F.E. **Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive results**. Mutation research, V 203:297-308 (1988)
59. Tenorio M. E., **Comparison of cytostatic drugs to induce intrachromosomal recombination in mammalian cells**. Department of genetic and cellular toxicology, Universidad de Estocolmo, Suecia 1999.

## Apéndice I

### A . Medio de cultivo regular 68-1 (modificado por M. E. de la Rosa)

Proporciones para preparar un litro de medio.

Agua destilada	1000 mL
Agar en fibra	12 g
Harina de maíz	63 g
Sacarosa	35 g
Dextrosa	25g
Levadura en polvo	34g
Ácido Propiónico	5 mL
Tegosept	5 mL

### B. Solución de Faure.

glicerol	20ml
goma arábica	30g
hidrato de cloral	50g
agua	50ml

Disolver la goma arábica en agua tibia



Apéndice II

Modelo de proliferación celular en los discos imagales del ala de *Drosophila melanogaster*

tiempo h	ciclo no.	célula no.	Número total de mitosis				Por suceder %	Tamaño del clon (células)	Tamaño del clon Clase.
			En el ciclo		<u>completas</u>				
			no.	%	%				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
35		21			0.01	99.99			
43.5	1	42	21	0.01	0.17		257-512	10	
52	2	85	42	0.17	0.35	99.65	129.256	9	
60.5	3	191	85	0.35	0.78	99.22	65.128	8	
69	4	381			1.56	98.44		7	
77.5	5	762	381	1.56	3.13	96.88	17-32	6	
86	6	1525	762	3.13	6.25	93.75	9-16	5	
94.5	7	3050	1525	6.25	12.50	87.50	5-8	4	
103	8	6100	3050	12.50	25.00	75.00	3-4	3	
111.5	9	12200	6100	25.00	50.00	50.00	2	2	
120	10	24400	12200	50.00	100.00		1	1	

Explanation of columns: (1) tiempo de desarrollo en horas. (2) Número sucesivo de ciclos mitóticos. (3) Número de células al principio de un ciclo dado. (4) Número total de mitosis que ocurren durante un ciclo. (5) porcentaje de mitosis totales.